

EINE EINFACHE RADIOMETRISCHE
HISTIDASE - MESSMETHODE
FÜR LEBER - UND EPONYCHIALGEWEBE

GEORG WEGELE

~~1984~~

Diss.
München
1985

Aus der Kinderklinik der Universität München/LMU

Direktor: Prof. Dr. H.- B. Hadorn

EINE EINFACHE RADIOMETRISCHE HISTIDASE-MESSMETHODE
FÜR LEBER- UND EPONYCHIALGEWEBE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Georg Wegele

aus
Günzburg/D

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. W. Endres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H.B. Hadorn

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 09. April 1985

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die bei der Entstehung dieser Arbeit behilflich waren; insbesondere bei Herrn PD. Dr. W. Endres und Frau Dr. Y. Shin, Herrn M. Rieth, Frau A. Stolla sowie bei allen anderen Mitarbeitern des Stoffwechsellabors der Dr. von Haunerschen Kinderklinik/München.

Ebenso herzlichen Dank an Frau Dr. Scheibenreiter und Herrn Prof. Dr. Thalhammer/Universität Wien für die Bereitstellung des Probenmaterials.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Materialien und Methoden	9
1. Histidinnachweis mit Ninhydrin	9
2. Radioaktivitätsmessung mit ^{14}C -Histidin	9
3. Urocaninsäuremessung	10
4. Ionenaustauschsäulenchromatographie	10
4.1. Anionen/Kationenaustauscher	11
4.2. Versuch mit Dowex-Kunstharz	12
5. Einstellen der Säulenhöhe	13
6. Ermittlung des geeigneten Puffer-pH	13
7. Reinigen des Kunstharges	14
8. Das Versuchsgemisch	14
9. Das Probenmaterial	15
10. Homogenisieren des Probenmaterials	16
11. Proteinmessung	16
12. Aktivitätsberechnung	17
13. Identifikation von Urocaninsäure und Histidin	18
III. Ergebnisse	20
1. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationszeit und der Proteinmenge	20
1.1. Abhängigkeit von der Inkubationszeit	20
1.2. Abhängigkeit von der Proteinmenge	20
2. Abhängigkeit vom pH-Wert des Versuchsgemischs	21
3. Stabilitätstest	25
4. Einfache Methode der Histidase-Messung	27
5. Versuchsergebnisse mit adulter und fetaler Leber	29
6. Ergebnisse mit Eponychialhaut	33

IV. Diskussion	36
1. Histidin als essentielle Aminosäure	36
2. Histidaseaktivität in der Haut	36
3. Möglichkeit einer Diätbehandlung	38
V. Zusammenfassung	41
Literaturverzeichnis	43
Lebenslauf	48

I. E I N L E I T U N G

Histidin ist eine von 20 verschiedenen Aminosäuren, die regelmäßig in Proteinen vorkommen. In der Fetalzeit und im Kleinkindalter gilt Histidin als essentielle Aminosäure. Man kann sie zur Gruppe der basischen Aminosäuren oder auch Diaminomonocarbonsäuren zählen. Histidin besitzt gegenüber anderen Aminosäuren noch eine zusätzliche basische Gruppe. Als markante Gruppe enthält Histidin, auch α -Amino- γ -Imidazolylpropionsäure genannt, das nur schwach basische Imidazolsystem ($pK=6,0$). Die basische Gruppe ist wichtig für die Ladung und die elektrophoretische Beweglichkeit dieser Aminosäure (6).

Beim Abbau im Körper wird Histidin u.a. durch das Enzym Histidindecaboxylase zu Histamin umgewandelt. Dieses Enzym wurde auch im tierischen und pflanzlichen Gewebe, sowie in Bakterien gefunden. In den Mastzellen finden sich besonders hohe Histaminkonzentrationen. Eine inaktive, gebundene Form wird bei Bedarf aktiviert und freigesetzt und zeigt als Wirkung eine Erweiterung der Blutgefäße, eine Steigerung der Drüsensekretion, eine Konstriktion der Bronchiolen, eine Blutdrucksenkung, und evtl. eine allergische Reaktion. Histamin wird durch Histaminase unter Hydrolyse zu Imidazolacetaldehyd und Ammoniak abgebaut und dadurch inaktiviert. Imidazolacetaldehyd wird durch die Enzyme Xanthinoxidase oder Acetaldehyddehydrogenase in Gegenwart von NAD^+ zu Imidazolessigsäure metabolisiert (17). Ein weiterer Abbauweg des Histamins führt zu Methylhistamin. Durch Imidazol-N-Methyltransferase werden Methylgruppen von S-Adenosylmethionin auf das Stickstoffatom des Imidazolrings übertragen (siehe auch Abbildung 1 und 2).

Histidin wird über einen zweiten Stoffwechselweg durch Transaminierung oder oxydative Desaminierung teilweise auch zu Imidazolpyruvat umgewandelt, welches dann durch oxydative Decarboxylierung zu Imidazolessigsäure weiter abgebaut wird.

Histidin ist u.a. auch an der Bildung der Dipeptide Carnosin (= β -Alanylhistidin), Homocarnosin und Anserin beteiligt. Diese kommen vor allem in Muskelgewebe vor. Ihre Funktion ist noch nicht ganz geklärt, es wird jedoch ein Zusammenhang mit dem Vitamin E-Stoffwechsel diskutiert. In der Kaninchenmuskulatur wurde bei Vitamin E-Mangel eine erniedrigte Konzentration von Carnosin und Anserin und eine erhöhte Ausscheidung von Methylhistidin im Urin gefunden. Vitamin E-Mangel kombiniert mit Muskeldystrophie geht also mit einer verminderten Bildung von Anserin und Carnosin einher (17). Ein weiterer Weg des Histidinstoffwechsels ist die Umwandlung in Hercynin, ein Trimethylammoniumderivat, das in Pilzen vorkommt. Aus Hercynin kann weiter Ergothionein entstehen, welches man im Mutterkorn gefunden hat und welches auch in Erythrozyten vorkommt. Es ist aber alimentären Ursprungs (siehe auch Abb. 2).

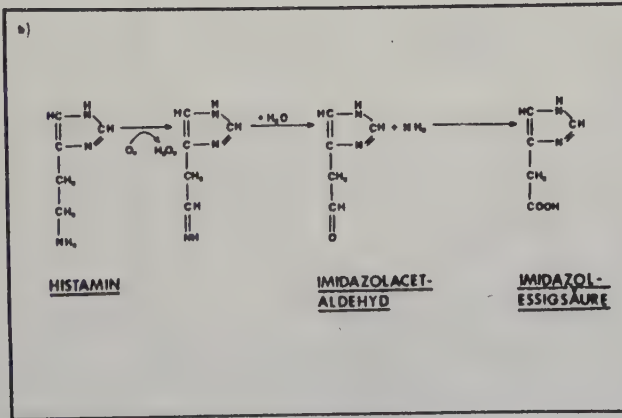
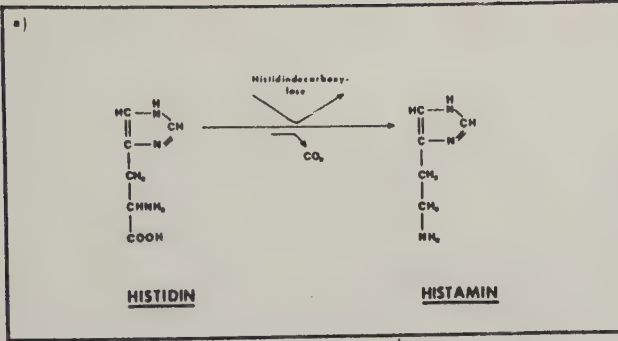


Abb. 1a: Decarboxylierung von Histidin zu Histamin.

Abb. 1b: Inaktivierung von Histamin.

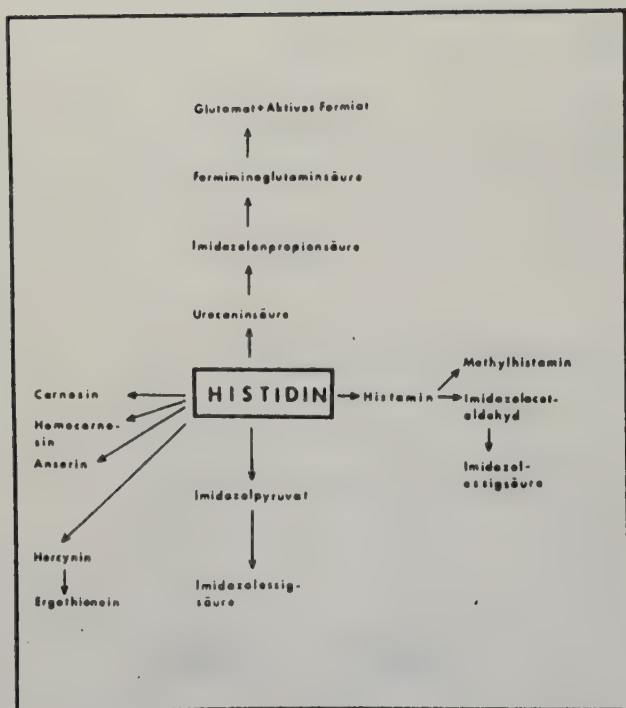


Abb.2: Schematische Zusammenfassung des Histidinstoffwechsels.

Beim wahrscheinlich wichtigsten Abbauweg wird Histidin zunächst durch ein Enzym unter Einführung einer Doppelbindung desaminiert. Dieses Enzym ist bekannt unter dem Namen "Histidin-Ammoniak-Lyase", "Histidin-Desaminase", oder einfach als "Histidase". Durch dieses Enzym entsteht in einem irreversiblen Schritt die ungesättigte Verbindung Urocaninsäure (17), welche zuerst 1874 von Jaffe im Hundeharn gefunden wurde und daher ihren Namen hat. Urocaninsäure wurde u.a. auch im Schweiß gefunden und man vermutet, daß sie eine Schutzwirkung gegen UV-Strahlung vermittelt (17). Unter Anlagerung von Wasser wird die Verbindung mit Hilfe des Enzyms Urocanase weiter zu Imidazolonpropionsäure umgewandelt und durch enzymatische Hydrolyse des Imidazolonringes wird diese hauptsächlich zu Formimino-glutaminsäure abgebaut. Eine Ausnahme bildet der Abbau in fetaler Leber. Die Formiminogruppe kann als "aktives" C₁-Fragment auf Tetrahydrofolsäure übertragen werden und geht somit in den Folsäuremetabolismus ein. Aus einem Gemisch verschiedener Enzyme, aus Säugetierleber isoliert, ist es gelungen die Bildung von N-Formyltetrahydrofolsäure, Glutaminsäure, und Ammoniak aus Formimino-glutaminsäure und Tetrahydrofolsäure nachzuvollziehen (17).

Als Endprodukt dieses Histidinabbauweges erscheint Glutaminsäure, welche als Spaltprodukt wiederum Eingang findet in den Citronensäurezyklus bzw. die Harnstoffbildung (siehe auch Abbildung 2 und 3).

Zu einem kleinen Teil wird die instabile Imidazolonpropionsäure durch Oxydation zu 4-Ketoglutaminsäure umgewandelt. Ebenso findet eine nicht enzymatische Hydrolyse zu Formylisoglutamin und eine Oxydation zu Hydantoinpropionsäure statt.

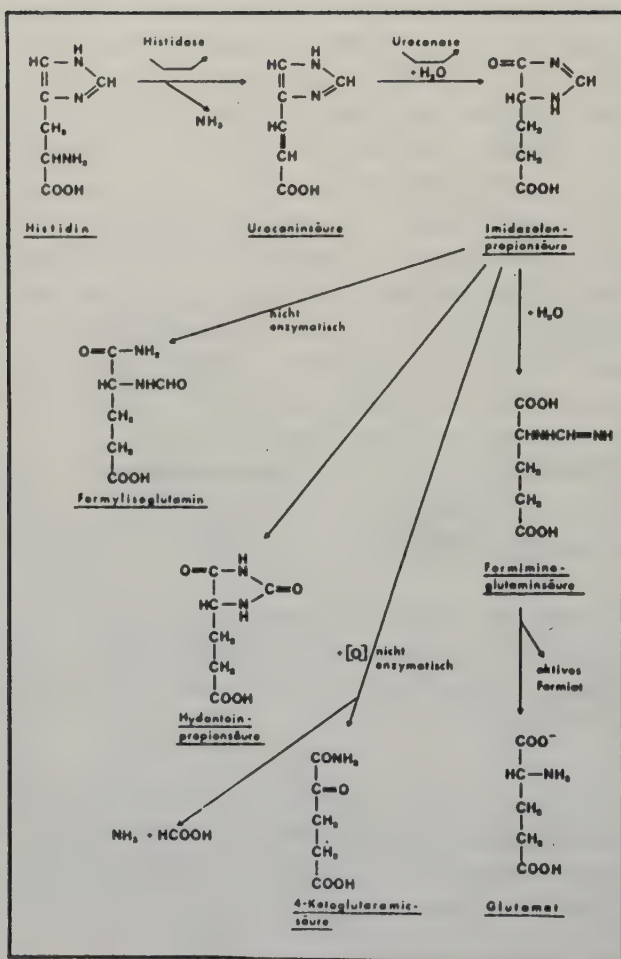


Abb. 3: Abbau des Histidins zu Urocaninsäure und Formimino-glutaminsäure.

Den Hauptweg des Urocaninsäureabbaus stellt aber die Umwandlung zu Formiminoglutaminsäure dar (siehe auch Abbildung 3). Bei einem Mangel oder einem Fehlen des Enzyms Histidase kommt es zu einer Anhäufung von Histidin im Blut bzw. im Urin (6, 8). Bei Histidase-Mangel, bekannt unter dem Namen Histidinämie, handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung. Die Häufigkeit liegt bei 1:16740 unter mehr als zwei Millionen untersuchten Neugeborenen (23). Erst auf Stoffwechselumwegen kann Histidin u.a. zu Imidazolbrenztraubensäure umgewandelt werden (27, 1, 2, 3, 4, 5). Bisher konnte die Histidinanhäufung bzw. der Mangel an Urocaninsäure durch Papierchromatographie, Guthrie-Test, Histidinbelastungstest, bzw. durch Messung des Urocaninsäurespiegels der Haut mehr oder weniger exakt bestimmt werden. Bei einem Teil der Histidinämie-Patienten wird von einigen Autoren über eine leichte Hirnschädigung und eine gestörte Sprachentwicklung berichtet (8, 23, 7, 9, 11, 18). Popkin et al. (19) analysierten frühere Veröffentlichungen und fanden anhand der beschriebenen Fälle heraus, daß das Risiko an einer geistigen Retardierung bzw. an einer Verzögerung der Sprachentwicklung zu leiden bei dieser Stoffwechselerkrankung etwa 40 % beträgt. Dies bedeutet also, daß Probanden gefunden wurden, bei denen die biochemische Abnormität zwar nachgewiesen war, die aber keine Krankheitssymptome zeigten. Ein Grund für diese unterschiedliche klinische Expressivität ist bisher nicht bekannt. Neville et al. (18) untersuchten in diesem Zusammenhang an Histidinämie erkrankte Kinder mit normaler Intelligenz und solche mit Entwicklungsstörungen. Sie konnten jedoch keine Unterschiede der biochemischen Parameter feststellen. Lyon et Veale (14) zeigten, daß bei Kindern, deren Mütter an Histidinämie erkrankt waren, diese Stoffwechselerkrankung eine mögliche Ursache für ZNS-Veränderungen sein könnte. Kuroda et al. (8, 9, 10) fanden mit einer radiometrischen Methode verschiedene Grade der Histidinämieerkrankung. Sie unterteilten ihre Patienten in eine Gruppe, die weniger als 10 % der Histidaseaktivität vom Normwert besaß, und in eine andere Gruppe, deren

Histidaseaktivität ca. 20 % vom Normalwert betrug. Sie zeigten auch, daß die beiden Gruppen unterschiedlich auf eine histidinarme Diät bzw. eine Histidinbelastung reagierten. Je geringer die gemessene Histidaseaktivität war, desto mehr häufte sich Histidin bei Belastung an. Nach Kuroda et al. ist die Wahrscheinlichkeit einer ZNS-Störung oder sprachlichen Entwicklungsverzögerung bei Histidinämiepatienten immerhin 10-fach höher als bei der Normalbevölkerung.

In dieser Arbeit soll nun die Entwicklung eines einfach durchzuführenden Enzymtests zur Messung der Histidaseaktivität beschrieben werden, mit dessen Hilfe es möglich ist, in kurzer Zeit eine größere Anzahl Proben zu untersuchen. Dabei wurden die Erkenntnisse der Arbeiten von La Du et al. (11), Auerbach et al. (1) und Kuroda et al. (8, 9, 10) zugrunde gelegt. Diese fanden die größte Histidaseaktivität in der Leber und in der Epidermis. Kuroda et al. verwendeten für ihren Test Eponychialhaut der Fingernägel. Nach Aufbereitung des Probenmaterials führten sie ihre Messungen mit Hilfe der Papierchromatographie und der Radioaktivitätsmessung durch. Im Gegensatz zu Kuroda et al. erfolgte die Trennung von Urocaninsäure und Histidin in diesem Enzymtest mit Hilfe der Säulenchromatographie. Die Messung wurde mit einer Radioaktivitätsmethode durchgeführt. Für eine exakte Trennung von Histidin und Urocaninsäure spielte der Ladungsunterschied eine wichtige Rolle.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

Im folgenden Abschnitt sollen die angewandten Meßmethoden und Materialien, sowie die Entwicklungsschritte des Versuchs zur Histidasemessung dargestellt werden.

1. Histidinnachweis mit Ninhydrin

Die Ninhydrinreaktion ist eine wichtige Nachweis- und Bestimmungsmethode der Aminosäuren. Ninhydrin reagiert mit der Aminogruppe der Aminosäuren, wobei ein blauer Farbstoff entsteht. Durch Messung der Elutionsgeschwindigkeit und colormetrische Bestimmung der Absorption können Aminosäuren voneinander unterschieden werden. Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, wird Histidin im ersten Schritt zu Urocaninsäure abgebaut. Beide unterscheiden sich durch eine NH_3^+ -Gruppe, die Histidin in α -Stellung besitzt.

Histidin reagiert also mit Ninhydrin und zeigt eine Blaufärbung. Urocaninsäure hingegen zeigt mit Ninhydrin keine Blaufärbung.

2. Radioaktivitätsmessung mit ^{14}C -Histidin

Beim Histidaseversuch wurde sehr viel mit ^{14}C -markiertem Histidin gearbeitet, welches von der Fa. Amersham-Buchler/Braunschweig bezogen wurde (Aktivität = $10 \mu\text{Ci/ml}$). Diese radioaktiv markierte Aminosäure wurde zum Versuchsgemisch zugegeben, was später noch ausführlicher beschrieben wird. Während der Säulenchromatographie wurde das Eluat in speziellen Gefäßen (=vials) der Fa. Zinsser/Frankfurt gesammelt. Es wurde Scintillationsflüssigkeit (Quickscint 402) der Fa. Zinsser-Analytic GmbH zugegeben und die Radioaktivität mit Hilfe eines Flüssigkeitsscintillationszählers gemessen. Verwendet wurde

das Modell 8960 Delta 300 der Fa. Searle Analytic Inc./Des Plaines Illinois. Es ließ sich somit die Elutionsgeschwindigkeit von Histidin exakt bestimmen. Mit der Radioaktivitätsmessung konnte man aber auch, nach Zugabe von Histidase, die ^{14}C -markierten Abbauprodukte messen.

3. Urocaninsäuremessung

Urocaninsäure wurde mit einem UV-Spektralphotometer gemessen. Die gesammelten Eluatproben wurden in Quarz-Küvetten gegeben (Präzisionsküvetten aus optischem Spezialglas 10 mm) und bei einer Wellenlänge von 278 nm gemessen. Diese Wellenlänge ist für Urocaninsäure spezifisch (27). Durch Messung des Absorptionsmaximums in Kombination mit der Säulenchromatographie erhielt man somit auch die Elutionsgeschwindigkeit von Urocaninsäure.

4. Ionenaustauschsäulenchromatographie

Bei der Ionenaustauschsäulenchromatographie wird eine Säule bestimmter Größe mit einer genau definierten Menge eines Ionenaustauschers (meist ein Kunstharz) gefüllt. Ionenaustauscher tragen saure (z.B. $-\text{SO}_3\text{H}$ oder $-\text{COOH}$) Gruppen oder basische (z.B. $-\text{NH}_3^+\text{OH}^-$) Gruppen. Beim Anionenaustauscher wird also an einer basischen Gruppe OH^- abdissoziiert und statt dessen z.B. eine Carboxylgruppe einer Aminosäure gebunden. Beim Kationenaustauscher kann die Säuregruppe des Kunstharzes Protonen abdissoziieren und Proben mit positiv geladenen Gruppen (z.B. NH_3^+ -Gruppen von Aminosäuren) binden. Je nach Stärke der Ladung erfolgt eine verschieden starke Bindung.

Gibt man nun auf eine mit Ionenaustauscher gefüllte Säule Probenmaterial und einen Puffer mit negativ geladenen Anionen bzw. mit positiv geladenen Kationen, so wird die festgehaltene

Aminosäure nach und nach "ausgewaschen", d.h. die Aminosäure wird aus ihrer Bindung verdrängt und erscheint im Eluat. Je schwächer die Aminosäure gebunden ist, desto früher erscheint sie im Eluat. Die Geschwindigkeit des "Auswaschens" ist hauptsächlich abhängig von der Dissoziationskonstanten K der einzelnen Gruppen und vom pH des Elutionsmittels. Bei der Trennung von Aminosäuren nutzt man die geringen Unterschiede in der Dissoziation von Amino- oder Carboxyl-Gruppen aus.

Im Eluat kann die Aminosäure nun zum Beispiel mit der Ninhydrinreaktion oder durch Radioaktivitätsmessung quantitativ bestimmt werden. Durch Kenntnis der Elutionsgeschwindigkeiten der einzelnen Aminosäuren kann auch eine qualitative Beurteilung stattfinden.

Für den Histidase-Versuch sollte nun der Ladungsunterschied zwischen Histidin und Urocaninsäure (siehe auch Abbildung 3) genutzt werden. Histidin besitzt eine NH_3^+ -Gruppe mehr. Das Problem lag in einer exakten Trennung von Histidin und Urocaninsäure durch die Säulenchromatographie.

4.1. Anionen-/Kationenaustauscher

Für den Versuch sollten nur kleine Säulen verwendet werden, die eine maximale Füllhöhe von ca. 5,0 cm besaßen.

Da Histidin eine freie NH_3^+ -Gruppe besitzt, wurde angenommen, daß Urocaninsäure eine insgesamt etwas negativere Ladung besitzt als Histidin und daher mit seiner Carboxylgruppe etwas stärker von Anionenaustauscher gebunden wird. Man verwendete DEAE-Cellulose, sowohl in Cl^- , als auch in OH^- -Form. Die Mini-Säulen wurden durch Schwerkraft bis zu einer Höhe von 1,0 cm gepackt. Man ließ als Proben jeweils 50 μl Histidin bzw. Urocaninsäure oben einsickern und spülte mit Aqua dest. bzw. HCl verschiedener Molarität

nach. Das Eluat wurde jeweils in kleinen Portionen gesammelt und mit Hilfe der Ninhydrinmeßmethode und des UV-Spektralphotometers ausgewertet. Der Versuch wurde mehrmals wiederholt, auch mit ^{14}C -Histidin und Radioaktivitätsmessung. Es erfolgte jedoch keine Trennung von Histidin und Urocaninsäure.

Derselbe Versuch wurde nun mit CM-Cellulose (=Carboxymethyl-Cellulose) als Kationenaustauscher wiederholt. Es sollte nun die NH_3^+ -Gruppe, die Histidin zusätzlich besitzt, gebunden werden. Aber erst nachdem der pH der CM-Cellulose auf pH 7,0 angeglichen worden war und ^{14}C -Histidin und Urocaninsäure mit 150 mM HCL auf pH 7,0 ausgeglichen wurden, erhielt man brauchbare Ergebnisse. Histidin wurde durch H_2O kaum ausgewaschen. Urocaninsäure wurde dagegen sehr schnell ausgewaschen. Damit die Aminogruppe von Histidin für die Bindung in ausreichend dissoziierter Form vorlag, war es notwendig gewesen einen pH von 7,0 zu wählen. Leider zeigte sich die CM-Cellulose bei Wiederholungsversuchen sehr empfindlich gegenüber kleinster Schwankungen der Versuchsbedingungen und brachte keine gleichbleibend exakte Trennung von Histidin und Urocaninsäure.

4.2. Versuch mit Dowex- Kunstharz

Um das Prinzip des Kationenaustauschers weiter zu erproben, verwendete man für die Säulen "Dowex Cation Resin AG-50 W-X 8 200-400 mesh" der Fa. Serva-Feinbiochemica/Heidelberg. Hiermit erzielte man von Anfang an gute Ergebnisse.

Die Säulengröße betrug anfangs 0,8 cm. Es wurde Histidin bzw. Urocaninsäure (jeweils 50 μl) darauf gegeben und mit verschiedenen Puffern nachgespült, u.a. auch mit 0,2 M Na-Citratpuffer pH 4,0. Die spektrophotometrische Messung zeigte bei diesem Versuch ein Maximum für Urocaninsäure

ungefähr beim sechsten Milliliter des gesammelten Eluats. Die Ninhydrinreaktion ergab ein Maximum der Blaufärbung (Histidinnachweis) etwa beim sechzehnten Milliliter des gesammelten Eluats.

5. Einstellen der Säulenhöhe

Der Durchmesser der bisher verwendeten Säulen betrug 0,8 cm. Die Füllhöhe sollte möglichst niedrig gehalten werden, aber dennoch eine gleichbleibend exakte Trennung von Histidin und Urocaninsäure gewährleisten. Die Füllhöhe betrug anfangs 0,8 cm, man konnte die Trennung durch eine vermehrte Säulenfüllung aber noch stabilisieren und verbessern. Es wirkte sich auch positiv aus, durch Änderung des Puffer-pH's die Elutionsgeschwindigkeit zu erhöhen. Eine sehr gute Trennung erhielt man, indem die Säulen jeweils mit genau 2,0 ml eines extra gereinigten und vorbereiteten Dowex-Kunsthharzes füllte. Nach dem Sedimentieren entsprach dies einer ungefähren Füllhöhe der Säulen von 2,0 cm. Um die so gefertigte Säulenfüllung beim späteren Einpipettieren der Proben nicht zu zerstören, wurde auf jede Säule obenauf ein Zellstoffplättchen gelegt.

6. Ermittlung des geeigneten Puffer-pH

Nach einigen Versuchen mit verschiedenen Elutionsmitteln erschien 0,2 M Na-Citrat-Puffer für den Test am meisten geeignet. Man verwendete "Mini-Säulen", mit gereinigtem Dowex-Kunsthharz gefüllt. Als Probenmaterial wurde ein Gemisch aus Urocaninsäure und ^{14}C -Histidin im Verhältnis 4:1 daraufgegeben. Die Radioaktivität des Histidins betrug $10 \mu\text{Ci/ml}$. Um in dem Gemisch eine gute Dissoziation zu erreichen, wurde ein 0,1 M Pyro-Phosphat-Puffer (=PPP) pH 9,2 hinzugefügt. Nachgewaschen wurde mit 0,2 M Na-Citrat-Puffer mit verschiedenen pH-Werten. Die ersten Versuche waren mit einem Puffer-pH von 3,5

und 4,0 durchgeführt worden. Man erhielt aber nur eine geringe und sehr verzögerte Trennung von Urocaninsäure und Histidin. Ein Puffer-pH von 5,3 brachte eine bedeutend bessere Trennung. Die ersten Versuche mit menschlichem Untersuchungsmaterial wurden bei einer Säulenhöhe von ca. 1,7 cm und einem Puffer-pH von 5,5 durchgeführt. Mit Festlegung der Säulengröße auf ca. 2,0 cm (=2,0 ml) wurde ein geeigneter Puffer-pH von 6,0 gewählt.

7. Reinigen des Kunstharzes

Um eine eventuell vorhandene Verschmutzung des verwendeten Kunstharzes zu beseitigen und eine störende Färbung beim Spülen der Säulen zu verhindern, wurde das Harz zusätzlich gereinigt. Es wurde, wie schon erwähnt, "Dowex Cation Resin AG-50 W-X 8 200-400 mesh" verwendet. Zunächst wurde das Kunstharz in ein Glasgefäß gegeben und mit reichlich 6 N HCL vermischt, das man ca. 10 Minuten einwirken ließ. Anschließend wurde HCL wieder abgefiltert und gut mit destilliertem Wasser nachgewaschen. Nach Abfiltern des Wassers wurde in einem zweiten Arbeitsgang das Kunstharz mit 1 N NaOH gemischt. Dabei entstand eine stärkere Rotfärbung des Harzes. Nachdem NaOH wieder abgefiltert worden war, wurde abschließend intensiv mit destilliertem Wasser nachgespült, bis die Färbung wieder verschwunden war. Der Ionenaustauscher war nun gereinigt und er wurde bis zum Gebrauch im Kühlraum bei + 4°C aufbewahrt.

8. Das Versuchsgemisch

Für die Radioaktivitätsmessung war es nicht notwendig ausschließlich ^{14}C -Histidin im Versuchsgemisch zu verwenden. Daher benutzte man im Versuch ein Gemisch, welches sowohl Histidin (20 mM) wie auch ^{14}C -Histidin enthielt. Dem Enzym Histidase sollte auf jeden Fall Histidin in ausreichender

Menge angeboten werden. Damit Histidin in ausreichend dissoziierter Form vorlag wurde dem Gemisch auch noch ein 0,1 M Pyro-Phosphat-Puffer (=PPP) beigelegt, dessen pH-Optimum im weiteren Versuch noch zu bestimmen war. Um einer eventuellen Inaktivierung des Enzyms von vorneherein vorzubeugen, fügte man ebenso noch 20 mM Dithiothreitol (=DTT) hinzu. Tabor und Mehler (21) beschreiben in ihrer Arbeit einen derart positiven Effekt für Glutathion. Endgültig erhielt man ein Gemisch aus Histidin/¹⁴C-Histidin/Pyro-Phosphat-Puffer/Dithiothreitol im Verhältnis 3:2:4:1.

9. Das Probenmaterial

Bei der Auswahl des Probenmaterials stützte man sich vor allem auf Arbeiten von Tabor und Mehler (21) und Kuroda et al. (8, 9, 10). Tabor und Mehler beschreiben in ihrer Arbeit mit Meerschweinchen-Leber und Haut, besonders Epidermis, als geeignetes Probenmaterial. Kuroda et al. verwendeten für ihre Tests mit Papierchromatographie Eponychialgewebe als Untersuchungsmaterial. Bei unseren Versuchen wurden diese Ergebnisse bestätigt. Messungen mit Fibroblasten, Amnionzellen, fetaler und adulter Haut, ergaben eine sehr niedrige, kaum meßbare Aktivität der Histidase.

Für den Histidaseversuch wurde Eponychialhaut der Finger als Untersuchungsmaterial gewählt, welches den Vorteil einer patientenschonenden, leichten Gewinnungsmöglichkeit bot. Die Patientenhaut wurde durch die freundliche Unterstützung von Frau Dr. S. Scheibenreiter und Herrn Prof. Dr. Thalhammer, Kinderhospital der Universität Wien zur Verfügung gestellt. Die Proben aus Fibroblasten, Amnionzellen, fetaler und adulter Haut stammten aus dem Labor von PD. Dr. Endres, Kinderklinik der Universität München.

Der Versandt der Eponychialproben erfolgte in Eppendorfhütchen. Frühere Studien (21) und unser Stabilitätstest hatten ergeben, daß man dabei nur einen geringen Verlust der Enzymaktivität in Kauf nehmen mußte.

Bei etwa 25 Patienten, deren Eltern und Geschwistern, sowie bei Kontrollpersonen wurden mehrmals Histidasemessungen mit Eponychialhaut durchgeführt.

10. Homogenisieren des Probenmaterials

Damit das Probenmaterial für den Versuch verwendet werden konnte, mußte es zunächst homogenisiert werden. Hierzu verwendete man kleine Gewebestückchen von 0,3-0,5 mg Gewicht und gab diese in einen Glashomogenisator mit gekerbter Kolbenfläche. Ebenso gab man zu diesen Probestückchen, je nach Probenmaterial, die 50-100 fache Menge eines 0,01 M Pyro-Phosphat-Puffer pH 9,2 und homogenisierte anschließend per Hand, bis die Gewebestückchen zerkleinert waren. Im weiteren wurden die Proben kurz sonifiziert und danach für zwei Minuten bei 10.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Somit wurden die zerstörten Gewebeteile sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C tiefgefroren. In diesem Überstand war das Enzym Histidase enthalten, das man für den Versuch benötigte.

Versuche, das Probenmaterial noch von verschiedenen kleinmolekularen Bestandteilen mit Hilfe der Dialyse zu reinigen, um so das Enzym möglichst konzentriert zu erhalten, brachten keinen Fortschritt. Tabor und Mehler (21) beschreiben in ihrer Arbeit sogar eine völlige "Inaktivierung" des Enzyms durch Dialyse.

11. Proteinmessung

Zur Berechnung der Enzymaktivität war es notwendig, den Proteingehalt der verwendeten Gewebeproben zu messen. Die Proteinmenge des menschlichen Untersuchungsmaterials wurde mit Hilfe der "Mikro-Lowry-Proteinmessung" bestimmt und photometrisch gemessen. Hierzu wurden Quarzküvetten (10mm) der Fa. Hellma und ein Eppendorf-Photometer der Fa. Netheler und Hinz GmbH/Hamburg verwendet.

Mit bekannten Proteinwerten wurde hierzu eine Eichkurve erstellt, mit deren Hilfe man dann die Proteinmenge der Probe ermitteln konnte. Zusätzlich wurde die eingebrachte Probenmenge mit einer Präzisionswaage genau abgewogen, um später den Proteinwert pro Probenmenge bestimmen zu können.

12. Aktivitätsberechnung

Für den Histidase-Versuch wurde ^{14}C -Histidin mit einer Radioaktivität von $10 \mu\text{Ci/ml}$ verwendet. Im endgültigen Reaktionsgemisch war noch eine Radioaktivität von $0,06 \mu\text{Ci}/0,18 \text{ mol}$ enthalten. Mit einem Flüssigkeitsscintillationszähler wurde nun die Radioaktivität des gesammelten Eluats bestimmt. Zur Radioaktivitätsberechnung wurden die gemessenen Scintillations-"Blitze" pro Minute (=cpm, d.h. counts per minute) benutzt. Ebenso wurde ein 100%-Wert des eingebrachten Reaktionsgemisches gemessen (=cpm 100%). Durch das "Mitlaufenlassen" einer Säule ohne Reaktionsgemisch wurde der Leerwert des Eluats und die Strahlung der Raumumgebung gemessen (=cpm 0). Die spezifische Aktivität des Enzyms pro eingebrachter Menge Protein errechnete sich nach folgender Formel:

$$A = \frac{(\text{cpm Eluat} - \text{cpm 0})}{(\text{cpm 100\%} - \text{cpm 0})} \times \frac{C \times F}{t \times P} \quad (\mu\text{Mol/g/h})$$

C = Histidinmenge im Reaktionsgemisch (μMol)

F = Verdünnungsfaktor des Histidins im Reaktionsgemisch

t = Inkubationszeit (h)

P = Proteinmenge im Reaktionsgemisch (g)

Da beim Standard-Versuch immer das gleiche Reaktionsgemisch verwendet wurde (jeweils $30 \mu\text{l}$ Histidingemisch und $30 \mu\text{l}$ Probe), ergab sich für die Berechnung:

Der Anteil des Histidingemisches an Histidin betrug 3 von 10 Teilen (Verdünnungsfaktor $F = \frac{3}{10}$).

Man verwendete für das Gemisch 20 millimolares Histidin, woraus sich ergab, daß in $30 \mu\text{l}$ eine Histidinmenge von

$$C = \frac{20 \times 30}{1000} \mu\text{Mol} \text{ enthalten war.}$$

Die Inkubationszeit betrug 3 Stunden ($t=3\text{h}$).

Der Proteinwert der Probe wurde in g/ml gemessen. Da man im Versuch auch $30 \mu\text{l}$ Probe verwendete, war also im Reaktionsgemisch jeweils eine Proteinmenge von $\frac{\text{gemessener Proteinwert}}{1000} \times 30$ (g) enthalten.

13. Identifikation von Urocaninsäure und Histidin

Um die ausgewaschenen Substanzen im Eluat genau bestimmen zu können, verwendete man zur Identifikation von Histidin und Urocaninsäure Mini-Säulen ($0,8 \times 2,0 \text{ cm}$), die mit gereinigtem Dowex gefüllt und für den endgültigen Standard-Versuch vorbereitet waren. Als Proben wurden jeweils $50 \mu\text{l}$ Histidingemisch, $50 \mu\text{l}$ reine Urocaninsäure und $50 \mu\text{l}$ reine Formiminoglutamin-

säure aufgetragen. Die Identifizierung von Formiminoglutaminsäure war deshalb nötig, weil beim Versuch mit adulter Leber (siehe auch Teil III, 5.) ein weiteres Abbauprodukt von Histidin entstanden war (siehe auch Abbildung 3). Gespült wurde mit 0,2 M Na-Citrat-Puffer pH 6,0. Das Eluat wurde in 0,5 ml-Fractionen gesammelt. Gemessen wurde Formiminoglutaminsäure mit dem UV-Spektralphotometer bei 224 nm, Urocaninsäure mit dem UV-Spektralphotometer bei 278 nm und Histidin mit dem Flüssigkeitsscintillationszähler.

Im Eluat wurde zuerst Formiminoglutaminsäure bei 1,0 ml ausgewaschen, Urocaninsäure erschien bei 2,0 ml und Histidin erst bei 4,5 ml (siehe auch Abbildung 7).

Dieses Resultat bei der Bestimmung der Elutionsgeschwindigkeiten überrascht nicht, wenn man sich das Prinzip der Säulenchromatographie mit Kationenaustauschern nochmals in Erinnerung ruft (siehe auch Teil I, 4).

Histidin besitzt eine NH_3^+ -Gruppe mehr als Urocaninsäure und Formiminoglutaminsäure und wird daher am meisten gebunden. Es erscheint zuletzt im Eluat. Urocaninsäure besitzt keine NH_3^+ -Gruppe und auch nur eine COO^- -Gruppe. Sie bildet das zweite Maximum. Bei Formiminoglutaminsäure ist der Imidazolring gespalten, es besitzt somit eine zweite COO^- -Gruppe und erscheint zuerst im Eluat (siehe Abbildung 7).

III. E R G E B N I S S E

1. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationszeit und der Proteinmenge

Um die Abhängigkeit der Enzymaktivität in Leber- und Hautgewebe von der Zeit und der Enzymmenge zu zeigen, wurden zwei weitere Versuche durchgeführt.

1.1. Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Man benutzte die bisher bekannten Versuchsbedingungen. Als Probenmaterial verwendete man Gewebe von fetaler und adulten Leber (Human-Leber). Geändert wurde bei dem Versuch lediglich die Inkubationszeit. Bei drei Parallelversuchen inkubierte man das Reaktionsgemisch eine bzw. zwei bzw. drei Stunden. Nach Auswertung der Meßergebnisse erhielt man eine lineare Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationszeit. Als Grundbedingung konnte man voraussetzen, daß im Reaktionsgemisch eine genügend große Menge Enzym vorhanden war (siehe auch Abbildung 4).

1.2. Abhängigkeit von der Proteinmenge

Auch dieser Versuch wurde unter der erarbeiteten optimalen Bedingung durchgeführt. Für alle Parallelversuche wurde die gleiche Inkubationszeit benutzt, nämlich drei Stunden, wobei diesmal nur die jeweils eingebrachte Menge des Probenmaterials (=Enzym) verändert wurde. Fetale und adulte menschliche Leber wurde mit den Verdünnungen 1:10, 1:30, 1:50 und 1:70 verwendet. Bei der Messung ergab sich auch bei diesem Versuch eine lineare Abhängigkeit der Enzymaktivität von der eingesetzten Enzymmenge (siehe auch Abbildung 5).

2. Abhängigkeit vom pH-Wert des Versuchsgemisches

Es hatte sich gezeigt, daß das Gelingen des Versuchs sehr stark mit dem pH-Wert des Versuchsgemischs zusammenhing. Man mußte nun den pH-Wert herausfinden, bei dem Histidin am besten dissoziiert vorlag. Die Einstellung des pH-Wertes im Gemisch sollte über die Zugabe von Pyro-Phosphat-Puffer mit dem entsprechenden pH-Wert erfolgen.

Es wurden Probeversuche mit gleichbleibenden Gemischen durchgeführt, die aber Pyro-Phosphat-Puffer mit jeweils verschiedenem pH-Wert enthielten. Verwendet wurden folgende pH-Werte: 7,5; 8,0; 8,5; 8,75; 9,0; 9,2; 9,5.

Es ergaben sich gute Werte für die Trennung von Histidin und Urocaninsäure bei einem Puffer-pH zwischen 8,5 und 9,2. Ein Optimum der Trennung erhielt man mit einem Pyro-Phosphat-Puffer pH 8,75. Dieser Puffer-pH wurde auch im endgültigen Histidingemisch des Versuchs verwendet (siehe auch Abbildung 6).

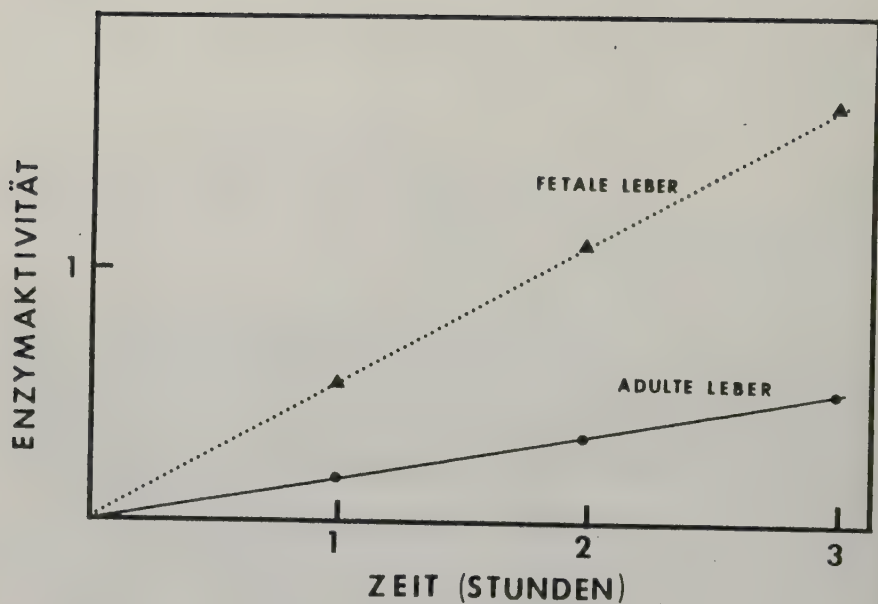


Abbildung 4: Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationszeit

Probenmaterial: adulte und fetale Leber

Dowex Mini-Säulen (0,8 x 2,0 cm)

Elutionsmittel: 0,2 M Na-Citratpuffer pH 6,0

Inkubationszeit: 1h, 2h, 3h

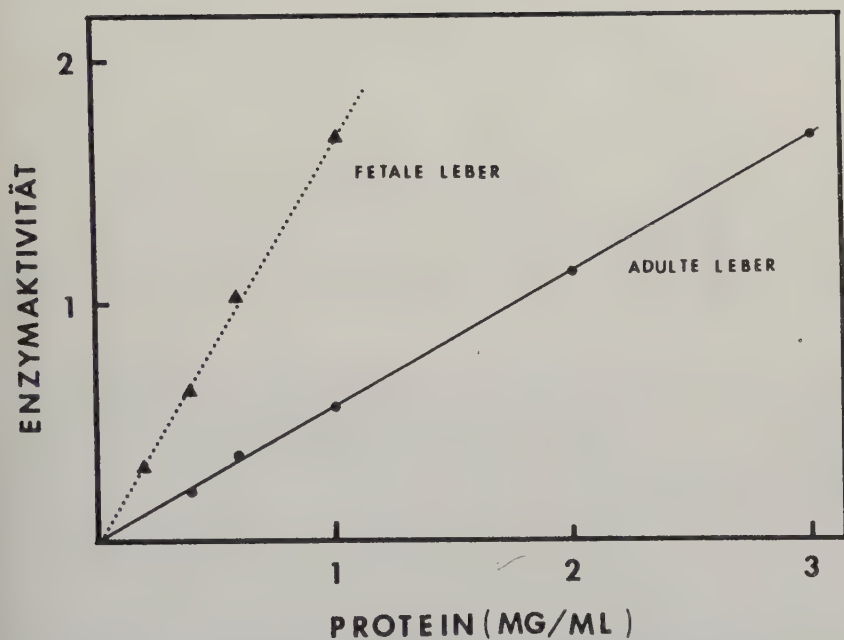


Abbildung 5: Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Enzymmenge

Probenmaterial: adulte und fetale Leber
 Dowex Mini-Säulen (0,8 x 2,0 cm)
 Elutionsmittel: 0,2 M Na-Citratpuffer pH 6,0
 Inkubationszeit: 3h

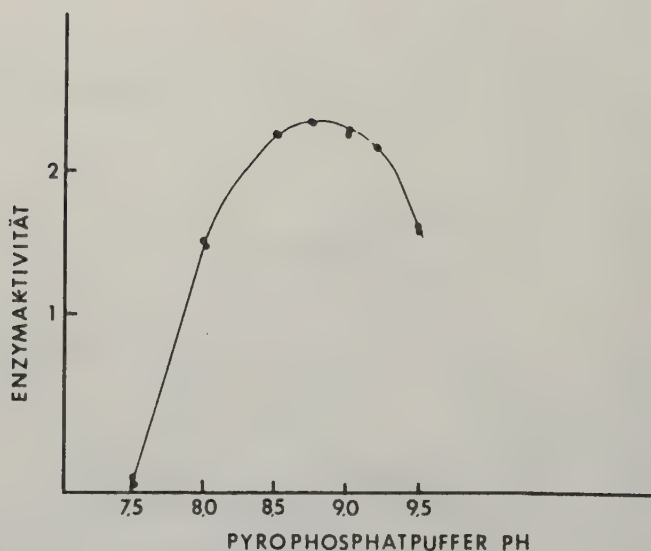


Abbildung 6: Ermittlung des pH-Optimum im Gemisch

Probenmaterial: adulte und fetale Leber

Dowex Mini-Säulen (0,8 x 2,0 cm)

Elutionsmittel: 0,2 M Na-Citratpuffer pH 6,0

Pyro-Phosphat-Puffer pH im Gemisch:

7,5; 8,0; 8,5; 8,75; 9,0; 9,2; 9,5

Inkubationszeit: 3 h

3. Stabilitätstest

Um zu testen, ob das Enzym Histidase durch längeres Aufbewahren bei -20°C nicht zerstört wird, wurde ein Stabilitätstest durchgeführt. Hierzu verwendete man verschiedene Proben von Eponychialgewebe. Die Proben wurden homogenisiert und der Überstand gewonnen, wie schon oben beschrieben worden war. Mit einem Teil von jeder Probe führte man nun sofort den Enzymtest durch. Der Rest wurde jeweils bei -20°C aufbewahrt. Ihn verwendete man für Enzymtests, die eine bzw. vier Wochen später durchgeführt wurden. Anhand der erhaltenen Meßergebnisse konnte man die Aktivitätsminderung ermitteln (siehe Tabelle 1). Ebenso testete man frisch homogenisiertes Probenmaterial, wovon ein Teil zwei Stunden im Eisbad aufbewahrt wurde. Bei letzterem Kurzzeittest ergab sich keine Änderung der Enzymaktivität.

Bei längerer Aufbewahrung bei -20°C erhielt man jedoch eine geringe Aktivitätsminderung des Enzyms. Dies galt für das homogenisierte Probenmaterial. In späteren Versuchen war man daher stets bemüht, homogenisiertes Probenmaterial möglichst schnell zu testen und zu messen.

Versuche mit nicht zerstörten Gewebezellen zeigten ein relativ stabiles Enzym. Tabor und Mehler (21) hingegen konnten bei Zellen, die sie bei -15°C über mehrere Monate aufbewahrten, keine Aktivitätsminderung der Histidase feststellen.

Tabelle 1:

Stabilitätstest

Aufbewahrungszeit bis zum Test	Aktivität in $\frac{\mu\text{Mol}}{\text{g/h}}$	Aktivität in Prozent %
0 Stunden	62,5	100
2 Stunden bei 0°C	62,5	100
2 Stunden bei 27°C	62,5	100
1 Woche bei -20°C	50,0	80
4 Wochen bei -20°C	50,0	80

4. Einfache Methode der Histidase-Messung

Es sollen hier nochmals kurz die Ergebnisse der Vorversuche zusammengefaßt werden und der endgültige Versuchsaufbau beschrieben werden: Man verwendete Säulen mit 0,8 cm Durchmesser. Extra gereinigtes Dowex Cation Resin AG 50W-X8 (200-400 mesh) der Fa. Serva Biochemic/Heidelberg wurde vor dem Füllen der Säulen mit 0,2 M Na-Citrat-Puffer pH 6,0 im Verhältnis 1:1 vermischt. Eine Sedimentation wurde mit Hilfe eines Magnetrührers verhindert. Jeweils 2,0 ml Dowex-Kunstharz wurden in die Säulen gefüllt, was einer Säulenhöhe von etwa 2,0 cm entsprach. Auf die Säulen wurde ein Zellstoffplättchen gegeben, um eine Beschädigung der Säulen beim späteren Einpipettieren der Proben zu verhindern. 0,3-0,5 mg schwere Gewebeproben wurden mit einem Glashomogenisator in der 100-fachen Menge eines 0,01 M Pyro-Phosphat-Puffer pH 9,2 homogenisiert, kurz sonifiziert und anschließend für 2 Minuten bei 10.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und weiterverwendet.

Es wurde ein Histidingemisch hergestellt, welches sich wie folgt zusammensetzt:

- 4 Teile 0,1 M Pyro-Phosphat-Puffer pH 8,75
- 3 Teile 20 mM Histidin
- 2 Teile ^{14}C -Histidin ($10\mu\text{Ci/ml}$)
- 1 Teil 20 mM Dithiothreit

Jeweils 30 μl dieses Histidingemisches wurden in ein Eppendorf-Hütchen einpipettiert.

Durch Zugabe von jeweils 30 μl Probenüberstand wurde die Reaktion gestartet. Das Reaktionsgemisch wurde gerüttelt und 3 Stunden bei 37°C inkubiert.

Beim Leerwert wurde an Stelle des Probenüberstandes 30 μ l destilliertes Wasser zugegeben. Ansonsten wurde der Leerwert wie die anderen Proben weiterbehandelt und gemessen. Nach 3 Stunden Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 5 μ l 75%-iger Trichloressigsäure (=TCA) gestoppt. Außerdem wurden noch 5 μ l Urocaninsäure (10 mM) zugegeben, um bei der späteren Säulenchromatographie zu bewirken, daß die während der Inkubation gebildeten evtl. geringen Mengen Urocaninsäure nicht total in der Säule gebunden werden.

Im weiteren Verlauf wurden nun zur Trennung von Histidin und der gebildeten Urocaninsäure (bzw. Formiminoglutaminsäure) jeweils 50 μ l des Reaktionsgemisches auf die vorbereiteten "Mini-Säulen" (0,8 x 2,0 cm) gegeben. Mit einem 0,2 M Na-Citrat-Puffer pH 6,0 als Elutionsmittel wurden die Säulen gewaschen.

Die ersten 3 Milliliter des Eluats wurden gesammelt und mit 18 ml Scintillationsflüssigkeit vermischt. Um eine etwaige Trübung zu verhindern, wurden noch 1,4 ml HCL (150 mM) hinzugegeben. In diesen ersten 3 Millilitern Eluat waren die Abbauprodukte von Histidin enthalten, d.h. Urocaninsäure und eventuell auch noch Formiminoglutaminsäure, sofern mit adulter Leber als Probenmaterial gearbeitet wurde. Das Rest-Histidin, das nicht abgebaut worden war, erschien selbst erst später im Eluat bei 4,5 ml. Histidin konnte natürlich nur auf diesem Wege abgebaut werden, wenn sich das Enzym Histidase im Probenmaterial befand.

Aus den übrig gebliebenen Reaktionsgemischen in den Eppendorf-Hütchen (jeweils ca. 20 μ l) wurden insgesamt 50 μ l verwendet, mit 3 ml 0,2 M Na-Citrat-Puffer pH 6,0 vermischt und mit 18 ml Scintillationsflüssigkeit und 1,4 ml 150 mM HCL aufgefüllt. Der erhaltene Wert entsprach dem 100%-Wert. Alle Messungen wurden als Doppelmessung durchgeführt. Die Radioaktivitätsmessung erfolgte mit dem Flüssigkeitsscintillationszähler.

Durch Messung der Radioaktivität im ursprünglichen Reaktionsgemisch (=100%-Wert), im Leerwert und der Radioaktivität der gebildeten Urocaninsäure bzw. von Formiminoglutaminsäure in den Proben konnte man die Aktivität des Enzyms Histidase ermitteln. Hierzu benutzte man die Formel zur Aktivitätsberechnung (siehe auch II.12), in welche man die gemessenen Werte nur noch einzusetzen brauchte.

5. Versuchsergebnisse mit adulter und fetaler Leber

Gewebe von adulter Leber wurde wie oben beschrieben aufbereitet, mit dem Histidingemisch inkubiert und anschließend auf die vorbereitete Säule gegeben. Beim Messen von Urocaninsäure mußte man feststellen, daß man zwei Maxima erhielt. Histidin wurde bei diesem Versuch in der dafür typischen Fraktion ausgeschwemmt. Das zweite Maximum der gemessenen Urocaninsäure entsprach in der Elutionsgeschwindigkeit den Versuchen mit reiner Urocaninsäure. Es mußte sich also beim zweiten Maximum um, im Versuch gebildete, Urocaninsäure handeln. Das erste Maximum wurde folglich von einem Stoff gebildet, der von der Säule weniger gebunden wurde als Urocaninsäure und eventuell eine negative Gruppe mehr besaß.

Einen solchen Stoff fand man auch im Histidinmetabolismus als weiteres Abbauprodukt von Urocaninsäure, nämlich Formiminoglutaminsäure (siehe auch Abbildung 3).

Urocaninsäure wird durch 1,4-Anlagerung von Wasser und Verschiebung der Doppelbindung zu Imidazolonpropionsäure weiterverwandelt. Durch enzymatische Hydrolyse des Imidazolons entsteht Formiminoglutaminsäure.

Dieses Ergebnis wurde auch bei mehrmaliger Wiederholung des Versuchs bestätigt (siehe auch Abbildung 7). Bei Versuchen mit fetaler Leber dagegen konnte man keine Bildung von Formimino-

glutaminsäure feststellen. Histidin wurde nach unseren Messungen ausschließlich zu Urocaninsäure abgebaut (siehe auch Abbildung 8).

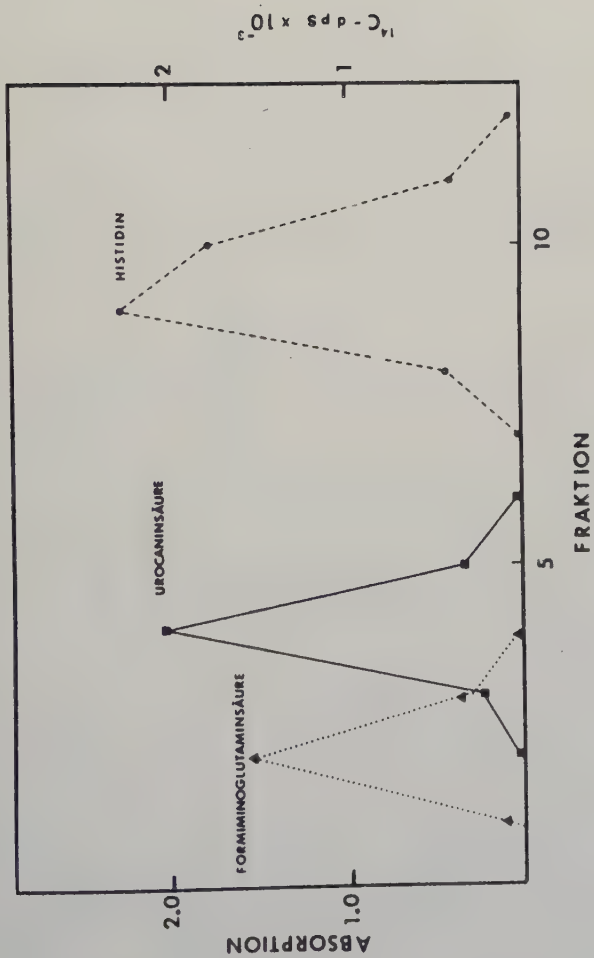


Abbildung 7: Trennung von Formiminoglutaminsäure, Urocaninsäure und Histidin mit Hilfe der Ionenaustauschäulenchromatographie (Dies entspricht dem Elutionsmuster bei adulter Leber)

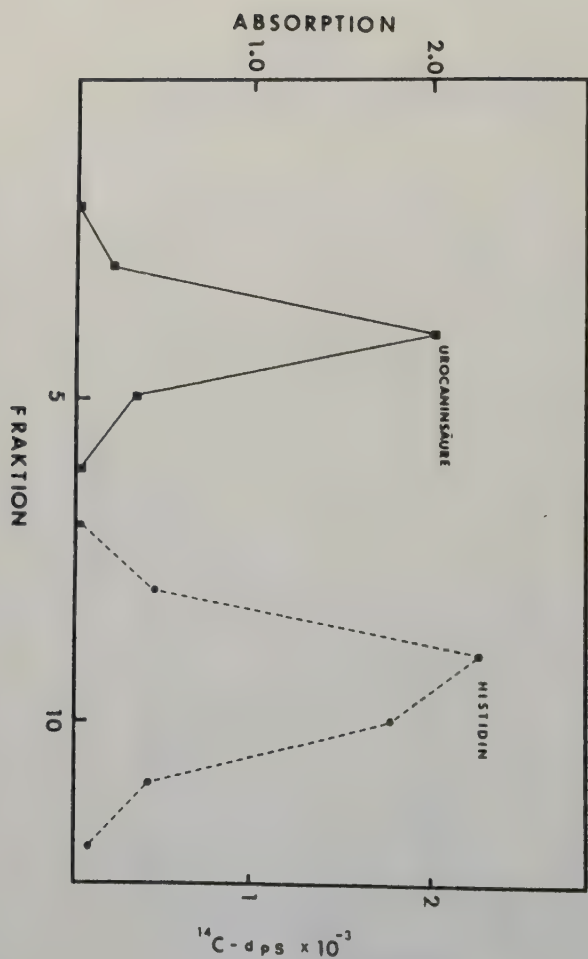


Abbildung 8: Elutionsmuster von Urocaninsäure und Histidin bei fetaler Leber und Eponychialhaut als Probenmaterial.

6. Ergebnisse mit Eponychialhaut

Bei Versuchen mit Eponychialhaut erhielt man, ebenso wie schon mit fetaler Leber, keine Formiminoglutaminsäure. Der Abbau von Histidin zu Urocaninsäure stellte den Meßergebnissen nach einen Endschrift dar. Der Abbau von Urocaninsäure zu Formiminoglutaminsäure geschieht normalerweise durch Hydrolyse mit Hilfe des Enzyms Urocanase (siehe auch Abbildung 3 und 8). Da man mit Eponychialhaut gute Versuchsergebnisse erhielt und das Untersuchungsmaterial leicht und für den Probanden schonend zu gewinnen war, wurde eine Untersuchung von Histidinämie-Patienten mit diesem Gewebematerial durchgeführt. E. Mally sowie Shin et al. gelang es in ihren Arbeiten eine deutliche Unterscheidung der Histidase-Aktivität bei homozygot Erkrankten, bei Heterozygot Erkrankten und bei der Kontrollgruppe zu erreichen (16, 20).

Man erhielt bei der Untersuchung folgende Werte:

Tabelle 2: Histidase-Aktivität bei verschiedenen Probandengruppen

<u>Anzahl der Probanden</u>		<u>Histidase-Aktivität</u> (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)
	N	(μ mol/h/g Protein)
Gesunde	10	52,3 $\pm$ 16,5
Heterozygote	21	16,5 $\pm$ 4,49
"Heterozygote- Zwischengruppe"	27	5,8 $\pm$ 0,80
Homozygote	37	1,46 $\pm$ 0,80

Abbildung 9 zeigt die ermittelten Meßergebnisse in einer graphischen Übersicht. Die Personen der Heterozygoten-Zwischengruppe zeigten, verglichen mit den eigentlichen Heterozygoten, etwas niedrigere Enzymaktivitäten; keiner von ihnen hatte Krankheitserscheinungen.

Bei den Ergebnissen konnte man keine lineare Abhängigkeit zwischen dem Histidin-Spiegel im Plasma (gemessen in Wien) und der Histidaseaktivität der Haut (siehe Versuchsergebnisse oben) feststellen (16, 20). Kuroda et al. (8) hingegen hatten über eine solche Abhängigkeit berichtet.

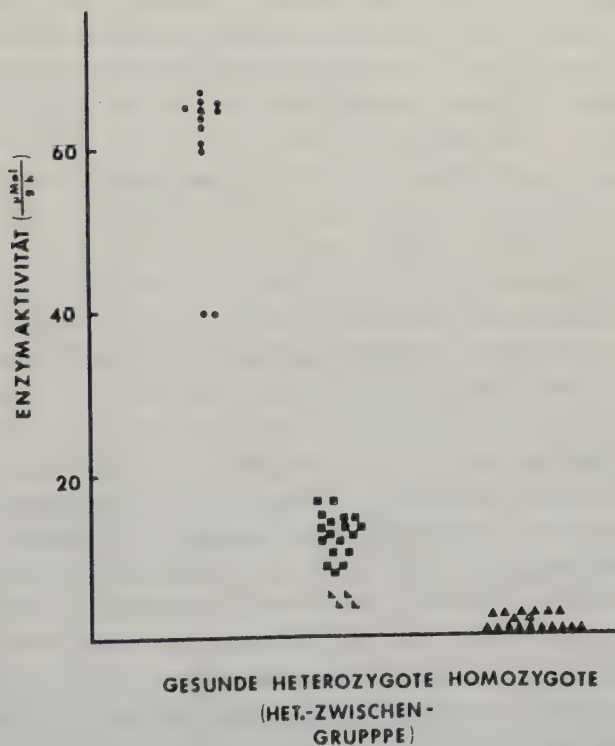


Abbildung 9: Enzymaktivitäten bei gesunden Kontrollpersonen, bei heterozygoten (+ Heterozygoten-Zwischen- gruppe) sowie homozygoten Histidinämie-Patienten

IV. D I S K U S S I O N

1. Histidin als essentielle Aminosäure

Da man beim Histidase-Versuch unterschiedliche Ergebnisse für fetale und adulte Leber erhalten hatte und auch die Wirkung einer Diät bei Histidinämie-Patienten umstritten ist, stellte man sich die Frage, ob Histidin eine essentielle Aminosäure ist oder nicht. In verschiedenen Untersuchungen hatte man für Ratten folgende Aminosäuren als essentiell erhalten: Valin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Histidin, Methionin, Phenylalanin, Tryptophan, Lysin. Auch für andere Säugetiere und Menschen wurden diese Resultate bestätigt (12, 13, 24).

Eine Ausnahme machte das Histidin beim Menschen. In den Untersuchungen beim Menschen wurde die Methode des Stickstoffgleichgewichts verwendet. Die Versuchspersonen erhielten eine Nahrung, deren Stickstoffgehalt so bemessen war, daß die N-Ausscheidung und die N-Aufnahme einander gleich waren. (Zustand des Stickstoffgleichgewichts). Die Nahrung enthielt anstelle von Protein entweder ein Eiweißhydrolysat oder eine Mischung reiner Aminosäuren. Beim Entfernen bzw. Weglassen einer essentiellen Aminosäure wurde die N-Bilanz negativ. Auf diese Weise erhielt man dieselben essentiellen Aminosäuren wie bei den Tierversuchen. Einzig das Weglassen des Histidins hatte keine sichtbare Wirkung. Es ließ sich allerdings auch nicht mit Sicherheit angeben, ob diese Aminosäure beim Menschen wirklich nicht essentiell ist. Möglicherweise sind die Reserven des Körpers so groß, daß sie bei den verhältnismäßig kurzandauernden Versuchen zur Deckung des Bedarfs ausreichen.

2. Histidaseaktivität in der Haut

Vergleicht man die Versuchsergebnisse (siehe Teil III, 1-6)

mit den Ergebnissen von verschiedenen Autoren, so findet man mehrere Übereinstimmungen, Kuroda et al. (9), die die Histidasebestimmung mit Hilfe von Papierchromatographie durchführten, fanden ebenfalls eine lineare Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationszeit und von der eingebrachten Enzymproteinmenge. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Zannoni et al. (27). Das pH-Optimum lag bei Kuroda et al. ebenfalls zwischen pH 8,0 und pH 9,0. Wright et al. (26), die die Histidasebestimmung nach der Methode von Tabor und Mehler (21) durchführten (spektrophotometrische Urocaninsäurebestimmung bei 277 nm), fanden diesbezüglich ähnliche Ergebnisse (pH 8,8 - 9,0).

Dagegen konnte kein Zusammenhang zwischen dem Serumhistidinspiegel und der Histidaseaktivität der Haut gefunden werden. Kuroda et al. hatten eine solche Korrelation gefunden (8). Woody et al. (25) und Thalhammer (23) hingegen fanden bei ihren Untersuchungen keine Korrelation der Histidinspiegel im Blut mit den Histidaseaktivitäten der Haut. Es erscheint also auch aufgrund der vorliegenden Arbeit nicht möglich, von der Histidaseaktivität der Haut auf den Serumhistidinspiegel zu schließen und umgekehrt. Dennoch war bei den Messungen mit Epnychialhaut eine ausreichende Unterscheidung von Homozygoten, Heterozygoten und Normalen gegeben und man erhielt keine Überschneidung der Normalwerte mit den Patientenwerten (siehe auch Teil III, 6).

Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode ist es möglich, mit geringen Mengen Epnychialhaut auch schon bei Säuglingen und Kindern die Histidaseaktivität der Haut zu messen. In der Dissertationsarbeit von E. Mally (16) wurde bei 25 Histidinämie-Patienten, deren Eltern und Geschwistern, sowie bei Kontrollpersonen die Histidaseaktivität der Haut bestimmt. Man erhielt eine eindeutige Trennung der Aktivitäten von genotypisch "gesunden" und homozygoten Probanden. Auch eine Unterscheidung von Heterozygoten und Homozygoten schien aufgrund der Ergebnisse möglich (siehe auch Abbildung 9).

Als Besonderheit stellte der Abbau von Histidin zu Urocaninsäure bei Messungen mit Eponychialhaut (und auch mit fetaler Leber) einen Endschritt dar. Beim Versuch mit adulter Leber dagegen erhielt man einen weiteren Abbau von Urocaninsäure zu Formiminoglutaminsäure. Die Umwandlung von Urocaninsäure zu Formiminoglutaminsäure geschieht normalerweise durch Hydrolyse mit Hilfe des Enzyms Urocanase (siehe auch Abbildung 2 und 3). Man konnte nun aufgrund der Ergebnisse annehmen, daß schon geringe Mengen des Enzyms Histidase in der adulten Leber ausreichend sind, um einen weiteren Abbau der gebildeten Urocaninsäure zu induzieren.

Beim Abbau von Histidin zu Urocaninsäure stellt sich sozusagen ein Gleichgewicht ein, bei dem Urocaninsäure ständig nachgebildet werden muß, da es sofort zu Formiminoglutaminsäure weiter umgewandelt wird (Urocanasewirkung).

Bei der fetalen Leber und der Eponychialhaut scheint dieser Induktionsmechanismus nicht vorhanden zu sein bzw. das Enzym Urocanase zu fehlen oder inaktiv zu sein. Der Histidinabbau hört bei Urocaninsäure auf. Ein Urocanasemangel müßte sich bei zusätzlich vorhandener verminderter Histidaseaktivität besonders stark auswirken.

Um weitere Rückschlüsse aus diesem Ergebnis ziehen zu können, müßten allerdings weitere Untersuchungen in dieser Richtung durchgeführt werden.

3. Möglichkeit einer Diätbehandlung

Da es sich bei der Histidinämie um eine Stoffwechselerkrankung mit vermindertem Abbau des Histidins handelt, wurde die Möglichkeit diskutiert, durch eine spezielle Diät eine Anhäufung des Histidins zu verhindern.

Wie schon erwähnt, wurde bei vielen Histidinämie-Patienten eine leichte geistige Retardierung, sowie Sprachentwicklungsstörungen und Verhaltensabnormitäten gefunden (7, 8, 9, 11, 18, 23). Andere Patienten zeigten wiederum keine dieser Krankheitssymptome. Bis jetzt konnten keine biochemischen Unterschiede zwischen Histidinämie-Patienten mit Krankheitserscheinungen und solchen, die symptomlos waren, gefunden werden. Die oben beschriebenen Auffälligkeiten wurden jedoch immer wieder in Zusammenhang mit Histidinämie-Patienten beschrieben. Es bestehen recht unterschiedliche Ansichten (7, 14, 15, 18, 19) darüber, ob und in welchem Ausmaß eine histidinarme Diät diese Krankheitszeichen verhindern kann. Tada et al. (22) schlugen eine histidinarme Diät während der frühen Kindheit vor, da sich in dieser Zeit das Gehirn besonders stark weiterentwickelt. Als Grenzwert wurden Histidinblutspiegel von 15 mg/dl angegeben.

Thalhammer (23) behandelte alle Histidinämie-Patienten ab einem Histidinblutwert von 8 mg/dl. Er berichtete über ein Kind, das, nachdem eine histidinarme Diät für einige Monate abgebrochen worden war, cerebrale Bewegungsstörungen entwickelte.

Daraufhin wurde wieder eine histidinarme Diät begonnen und die Erscheinungen verschwanden innerhalb der nächsten drei Monate.

Es scheint also durchaus möglich, daß die Krankheitssymptome bei Histidinämie-Patienten auf direktem oder indirektem Wege durch eine erhöhte Serumhistidinkonzentration bedingt sind, und folglich eine histidinarme Diät und ein dadurch erniedrigter Serumhistidinspiegel eine Verringerung oder ein Ausbleiben der klinischen Erscheinungen bringen könnte.

Die Unsicherheit in der Indikationsstellung der diätetischen Therapie wird auch dadurch verstärkt, daß erste Krankheitszeichen in Form von epileptischen Anfällen bei unbehandelten Histidinämie-Patienten noch im Alter von etwa 15 Jahren beobachtet wurden. Da jedoch die diesbezüglichen Erfahrungen noch nicht über einen längeren Zeitraum gesammelt werden konnten, sind weitere Beobachtungen notwendig, um die Wirkung einer histidinarmen Diät bei Histidinämie-Patienten besser beurteilen zu können.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

Die Histidinämie ist eine autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung. Das Enzym Histidase bewirkt den Abbau von Histidin zu Urocaninsäure und ein Fehlen oder Mangel des Enzyms führt zur Erkrankung an Histidinämie mit mehr oder weniger starken Krankheitserscheinungen.

In der vorliegenden Arbeit wird eine einfache Methode vorgestellt, die eine Aktivitätsmessung des Enzyms Histidase in der Haut ermöglicht. Es handelt sich um eine radiometrische Methode, die mit Hilfe von ^{14}C -Histidin und der Ionenaustauschsäulenchromatographie durchgeführt wird. Das Probenmaterial von Histidinämie-Patienten bestand aus Eponychialhaut.

Homogenisiertes Material wurde mit einem Histidingemisch für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Das Gemisch bestand aus 3 Teilen Histidin (20 mM), 2 Teilen ^{14}C -Histidin (10 $\mu\text{Ci/ml}$), 4 Teilen Pyro-Phosphat-Puffer pH 8,75 (0,1 M) und 1 Teil Dithiothreitol (20 mM). Gestoppt wurde die Reaktion mit 75%iger Trichloressigsäure.

Das Reaktionsprodukt wurde auf "Mini-Säulen", die mit Dowex-Kunstharz gefüllt waren (0,8 x 2,0 cm), gegeben. Nachgespült wurde mit 0,2 M Na-Citratpuffer pH 6,0. Das Eluat wurde gesammelt und mit Hilfe eines Flüssigkeitsscintillationszählers die Radioaktivität der in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Stoffe bestimmt. Durch Berechnung konnte die Aktivität ermittelt werden, mit der Histidase die Aminosäure Histidin zu Urocaninsäure umgewandelt hatte.

Bei Messungen mit Gewebe von adulter Leber konnte ein Abbau von Histidin zu Urocaninsäure und Formiminoglutaminsäure festgestellt werden.

Bei Messungen mit Eponychialhaut und fetaler Leber stellte der Abbau von Histidin zu Urocaninsäure einen Endschritt dar. Es wurde ein linearer Zusammenhang der Histidaseaktivität sowohl mit der Inkubationszeit als auch der Enzymmenge festgestellt. Auf diese Weise konnte eine große Anzahl Eponychialproben von Patienten mit Histidinämie gemessen werden.

Die Meßergebnisse zeigten eine deutliche Unterscheidung zwischen gesunden Personen, Heterozygoten und homozygot Erkrankten.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Auerbach, V.H., Di George, A.M., Baldrige R.C., Tourtelotte, C.D. and Brigham, M.P.:
Histidinemia: A deficiency in histidase resulting in the urinary excretion of histidine and of imidazole pyruvic acid.
J. Pediatr. 60, 487 (1962)
2. Buehring, K.U., Batra, K.K. and Stokstad, E.L.R.:
The effect of methionine on folic acid and histidine metabolism in perfused rat liver.
Biochem. Biophys. Acta 279, 498-512 (1972)
3. Kacser, H., Bulfield, G. and Wright, A.:
The Biochemistry and Genetics of Histidinaemia in the Mouse.
Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 33-41 (1979)
4. Kacser, H., Mya, K.M. and Bulfield, G.:
ENDOGENOUS TERATOGENESIS IN MATERNAL HISTIDINAEMIA.
Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 43-53 (1979)
5. Kamoun, P.P., Parvy, P., Cathelineau, L. and Meyer, B.:
Renal Histidinuria. J. Inher. Metab. Dis. 4, 217-219 (1981)
6. Karlson, P.:
Stoffwechsel der Proteine.
Kurzes Lehrbuch der Biochemie 157-158 (1977), Thieme Verlag Stuttgart
7. Komrower, G.M. and Sardharwalla, I.B.:
Histidinemia: To treat or not to treat ?
Lancet 1, 1047 (1974)

8. Kuroda, Y., Ogawa, T., Ito, M., Watanabe, T., Takeda, E.,
Toshima, K. and Miyao, M.:
Relationship between skin histidase activity and blood
histidine response to histidine intake in patients with
histidinemia.
Brief clin. a. lab. observ., 97, 269-272 (1980)
9. Kuroda, Y., Watanabe, T., Ito, M., Toshima, K. and Miyao,
M.:
Altered kinetic properties of skin histidase in two patient
with histidinemia.
J. Inher. Metab. Dis. 5 73-74 (1982)
10. Kuroda, Y., Ito, M., Ogawa, T., Takeda, E., Toshima, K. and
Miyao, M.:
A new sensitive method for assay of histidase in human skin
and detection of heterozygotes for histidinemia.
Clinica Chimica Acta, 96, 139-144 (1979)
11. La Du, B.N., Howell, R.R., Jacoby, G.A., Seegmiller, J.E.
and Zannoni, V.G.:
The enzymatic defect in histidinemia.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 7, 398 (1962)
12. Lee, N.S., Fitzpatrick, D., Meier, E. and Fisher, H.:
Influence of dietary histidine on tissue histamine concen-
tration, histidine decarboxylase and histamine methyl-
transferase activity in the rat.
Agents and Actions, vol. 11, 4 307-311 (1981)
13. Leuthardt, F.:
Intermediärstoffwechsel
640-643 (1977) de Gruyter-Verlag Berlin-New York,
1. Auflage

14. Lyon, I.C.T. and Veale, A.M.O.:
Histidinemia: To treat or not to treat
Lancet 1, 1047 (1974)
15. Lyon, I.C.T., Gardner, R.J.M. and Veale, A.M.O.:
Maternal Histidinemia, Arch. Dis. Child 46, 581 (1974)
16. Mally, E.:
Die Histidaseaktivität im Nagelbett von 24 Histidinämie-
familien und Studien zur Enzymkinetik
Dissertationsarbeit/Ludwig-Maximilians-Universität/München
1984
17. Meister, A.:
Biochemistry of the Aminoacids
818-841 (1965) Academic Press, New York-London 2. Edition
18. Neville, B.G.R., Bentovim, A., Clayton, B.E. and Shepard,
J.:
Histidinemia: Study of relation between clinical and
biological findings in 7 subjects.
Arch. Dis. Child 47 190 (1972)
19. Popkin, J.S., Clow, C.L., Scriver, C.R. and Grover, J.:
Is hereditary histidinemia harmful ?
Lancet 1, 721 (1974)
20. Shin, Y.S., Scheibenreiter, S., Wegele, G., Mally, E. and
Endres, W.:
A simple method for histidase assay and an alteration in
the affinity of skin histidase for histidine in
histidinemia
J. Inher. Metab. Dis. 6, 113-114, Suppl. 2 (1983)

21. Tabor, H. and Mehler, A.H.:
Histidase and Urocanase
In Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (eds), Methods in
Enzymology, Academic Press, New York and London, Vol. 2,
228-233 (1955)
22. Tada, K., Tateda, H., Arashima, Sch., Sakai, E., Kitagawa,
T., Aoki, K., Suwa, S., Kawamura, M., Oura, T., Takesada,
M., Kuroda, Y., Yamashita, F., Matsuda, I. und Naruse, H.:
Intellectual development in patients with untreated
Histidinemia.
Journal of Paediatrics Vol. 101, No.4, pp. 562-563 (1982)
23. Thalhammer, O.:
Neonatal Screening for Histidinemia.
Neonatal Screening for Inborn Errors of Metabolism
Hrsg.: H. Bickel, R. Guthrie, G. Hammersen; 59-65,
Springer Verlag (1980)
24. Watanabe, T., Kitamura, Y., Maeyama, K., Go, S., Yamato-
dani, A., Wada, H.:
Absence of increase of Histidine decarboxylase activity in
mast-cell-deficient W/W mouse embryos before parturition
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981 Vol. 78, No.7,
pp. 4209-4212
25. Woody, N.C., Snyder, H. and Harris J.A.:
Histidinemia
AM. J. Dis. Child 110:606 (1965)
26. Wright, A.F., Bulfield, G., Arfin, S.M. and Kacser, H.:
Comparison of the Properties of Histidine Ammonia-Lyase in
Normal and Histidinemic Mutant Mice.
Biochemical Genetics, Vol. 20, Nos. 3/4, 245-263 (1982)

27. Zannoni, V.G. and La Du, B.N.:

Determination of Histidine α -Deaminase in Human Stratum
Corneum and its Absence in Histidinaemia

Biochem. J., 88, 160-163 (1963)

LEBENS LAUF

- 1952 geboren am 01.05. in Günzburg als Sohn des Versicherungskaufmanns Eduard Wegele und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Eisenlauer
- 1952-73 wohnhaft in Günzburg
- 1959-63 Besuch der "Maria-Theresia-Volksschule" Günzburg
- 1963-73 "Dossenberger-Gymnasium" Günzburg, math.-Naturw. Zw.
- 1973 Reifeprüfung am 08. Juni 1973
- 1973 zweimonatiges Krankenpflegerpraktikum im Kreiskrankenhaus Günzburg (01.08.73-30.09.73)
- 1973-77 Zeitsoldat im Sanitätsdienst der Luftwaffe (01.10.73-30.09.77) Ausbildung als Krankenpfleger
- 1977-78 dreimonatige Tätigkeit im Pflegedienst des Kreiskrankenhauses Günzburg
- 1978-84 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
- 1980 Ärztliche Vorprüfung am 18.03.
- 1981 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung am 26.03..
- 1983 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung am 18.03.
- 1983-84 Praktische Ausbildung der Inneren Medizin im Zentralklinikum Augsburg, der Chirurgie im Klinikum Großhadern und der Kinderheilkunde in der Dr. v. Hauner-schen Kinderklinik/München
- 1984 Abschluß des Medizinstudiums mit dem Dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung am 21.05.

